

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/12, C07K 14/47, C12Q 1/68, A61K 38/17	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/11267 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. April 1996 (18.04.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE95/01390 (22) Internationales Anmeldedatum: 6. Oktober 1995 (06.10.95) (30) Prioritätsdaten: P 44 35 919.5 7. Oktober 1994 (07.10.94) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHWARZ, Elisabeth [DE/DE]; Schröderstrasse 37, D-69120 Heidelberg (DE). BARTELMANN, Matthias [LU/DE]; Steinschleifenweg 7, D-69198 Schriesheim (DE). REUTER, Marie-Stella [DE/DE]; Hans-Thoma-Strasse 8, D-69493 Hirschberg (DE). (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Müller-Boré & Partner, Grafinger Strasse 2, D-81671 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i>	
(54) Title: DNA CODING FOR A ZINC FINGER PROTEIN, A ZINC FINGER PROTEIN AND THE USE THEREOF (54) Bezeichnung: ZINKFINGER-DNA, -PROTEIN UND IHRE VERWENDUNG (57) Abstract The invention concerns DNA coding for a zinc finger protein and a protein of this type. The invention further concerns the use of the DNA and the protein in diagnosis, therapy or gene therapy of tumors. The DNA coding for the zinc finger protein is an insert of the cDNA clone COS AP4-E1. This clone comes from a cDNA library of the cervix carcinoma cell line ME180, which contains the human papilloma virus 68 DNA, and has four zinc fingers in its exon sequences. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft eine für ein Zinkfinger-Protein codierende DNA und ein solches Protein. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins in Diagnose, Therapie oder Genterapie von Tumoren. Die Zinkfinger-Protein kodierende DNA ist ein Insert des cDNA Klon COS AP4-E1. Dieser Klon entstammt einer cDNA-Bibliothek der Cervixcarcinomzelllinie ME180, die die Human Papillomvirus 68-DNA enthält, und besitzt 4 Zinkfinger in seinen Exon-Sequenzen.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LJ	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Zinkfinger-DNA, -Protein und ihre Verwendung

Die Erfindung betrifft eine für ein Zinkfinger-Protein codierende DNA und ein solches Protein. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins.

Die Umwandlung von normalen Zellen in Tumorzellen vollzieht sich in mehreren Teilschritten, bei denen es zu Veränderungen zellulärer Gene oder zum Erwerb viraler Onkogene kommt. Veränderungen zellulärer Gene umfassen die Aktivierung von Proto-Onkogenen durch Mutation, Genamplifikation, Überexpression oder Chromosomen-Translokationen sowie die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Mutation oder Deletion.

Verschiedene Gene, deren Veränderungen bei der Tumorentstehung von Bedeutung sind, konnten bislang identifiziert werden (vgl. Übersichtsartikel: Bishop, J.M., Cell 64 (1991), 235-248). Die Produkte solcher Gene haben verschiedene Funktionen. Sie wirken z.B. als Transkriptionsregulatoren, als Glieder unterschiedlicher Signaltransduktionsketten, wie Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren oder Proteinkinasen, bzw. als Aktivatoren oder Inhibitoren der Zellteilung.

Beispiele von Transkriptionsregulatoren sind Zinkfinger-Proteine. Diese Proteine besitzen charakteristische, zwei Cystein- und zwei Histidinreste enthaltende Strukturen, die so zueinander positioniert sind, daß sie ein Zinkatom binden. Zinkfinger-Proteine sind DNA-bindende Proteine. Ein Beispiel für Zinkfinger-Proteine ist das Produkt des Wilms-Tumorsuppressorgen WT1, dessen Verlust bei der Entstehung von Wilms-Nierentumoren eine wesentliche Rolle spielt.

Bis heute sind noch nicht alle an Tumorentstehung und -wachstum beteiligten Gene bzw. Genprodukte bekannt. Eine Tumordiagnose bzw. -therapie ist daher bisher nur begrenzt möglich.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem Tumordiagnose bzw. -therapie umfassender betrieben werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der Erfindung ist somit eine für ein Zinkfinger-Protein codierende DNA, die umfaßt:

- (a) die DNA der Nukleotide 446-1476 von Fig. 1 oder einen Teil davon,
- (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA, oder
- (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Der Ausdruck "hybridisierende DNA" weist auf eine DNA hin, die unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, mit einer DNA von (a) hybridisiert.

Fig. 1 zeigt das Insert des cDNA-Klons COS AP4-E1. Dieser Klon entstammt einer cDNA-Bibliothek der Cervixcarcinomzelllinie ME 180 (vgl. Reuter, M.S. et al., J. Virol. 65 (1991), 5564-5568). Diese Zelllinie enthält die Human Papillomvirus 68-DNA (HPV 68-DNA) stabil integriert. Der Klon COS AP4-E1 enthält zwischen den Nukleotiden 1-21 HPV 68-DNA. Ferner enthält er zwischen den Nukleotiden 22-1476 zelluläre Sequenzen, wobei diese zwischen den Nukleotiden 446-1476 Exon-Sequenzen eines Zinkfinger-Gens sind. Die Exon-Sequenzen codieren für 4 Zinkfinger: Zinkfinger 1: 1130-1191, Zinkfinger 2: 1214-1275, Zinkfinger 3: 1298-1360, Zinkfinger 4: 1382-1432. Der Klon COS AP4-E1 wurde bei der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen unter DSM 9450 am 30. September 1994 hinterlegt.

Vorstehende Insert-DNA, insbesondere zwischen den Nukleotiden 446-1476, kann Teil einer für ein vollständiges Zinkfinger-Protein codierenden DNA sein. Eine solche DNA und das durch sie codierte Zinkfinger-Protein sind somit auch Gegenstand der Erfindung.

Die Bereitstellung einer für vorstehendes Zinkfinger-Protein codierenden DNA

-3-

erfolgt in üblicher Weise. Beispielhaft wird die Insert-DNA von COS AP4-E1, insbesondere die DNA zwischen den Nukleotiden 446-1476, als Sonde zur Hybridisierung einer allgemein erhältlichen cDNA-Bibliothek aus Leber, Gehirn, Plazenta oder Muskel, vorzugsweise Leber, verwendet. Auch kann eine cDNA-Bibliothek aus Blutzellen oder HeLa-Zellen verwendet werden. Die genannten Gewebe und Zellen enthalten ausreichend RNA-Transkripte, die mit der Insert-DNA von COS AP4-E1, insbesondere der DNA zwischen den Nukleotiden 446-1476 hybridisieren (vgl. Fig. 2). Erhaltene Klone werden einer Sequenzierung unterzogen und ausgehend von der Insert-DNA von COS AP4-E1, insbesondere der DNA zwischen den Nukleotiden 446-1476, wird die ein vorstehendes Zinkfinger-Protein codierende DNA bestimmt.

Des weiteren eignet sich die Insert-DNA von COS AP4-E1, insbesondere die DNA zwischen den Nukleotiden 446-1476, und ganz besonders die DNA zwischen den Nukleotiden 1240-1476, zur Identifizierung einer genomischen für vorstehendes Zinkfinger-Protein codierenden DNA. Hierzu wird die entsprechende DNA von COS AP4-E1, z.B. die DNA zwischen den Nukleotiden 1240-1476, als Sonde zur Hybridisierung einer genomischen DNA-Bibliothek verwendet. Eine solche kann aus den vorstehend genannten Geweben und Zellen erstellt sein.

Erfindungsgemäß wird der Klon COS 1 APM erhalten. Seine Insert-DNA enthält in einem 5,5 kb großen SacI-Fragment die zur verwendeten Sonde, z.B. der DNA zwischen den Nukleotiden 1240-1476, entsprechende DNA. In den Figuren 3 und 4 ist diese DNA von COS 1 APM zwischen den Nukleotiden 256-492 präsentiert. Der Klon COS 1 APM wurde bei der DSM unter DSM 9462 am 07.10.1994 hinterlegt. Gegenstand der Erfindung ist somit auch eine genomische, das vorstehende Zinkfinger-Protein codierende DNA sowie das durch sie codierte Protein.

Erfindungsgemäß kann vorstehende für das Zinkfinger-Protein codierende DNA in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für E. coli sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate und pGEX-2T. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEF-

BOS, cDM8 und pCEV4, anzugeben sind. Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um vorstehende, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101 und JM 109, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* und die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero, und HeLa. Der Fachmann weiß, in welcher Weise vorstehende DNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß vorstehende cDNA in E.coli, Hefe oder tierischen Zellen exprimiert werden kann, während vorstehende genomische DNA nur in tierischen Zellen zu exprimieren ist. Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das exprimierte Zinkfinger-Protein zu isolieren und zu reinigen. Ein vorstehendes, rekombinant hergestelltes Zinkfinger-Protein ist somit auch Gegenstand der Erfindung.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Zinkfinger-Protein gerichteter Antikörper. Die Herstellung eines solchen erfolgt in üblicher Weise. Beispielsweise wird hierzu das Zinkfinger-Protein in BALB/c-Mäuse subcutan injiziert. Diese Injektion wird im Abstand von jeweils 3 Wochen wiederholt. Etwa 2 Wochen nach der letzten Injektion wird das den Antikörper enthaltende Serum isoliert und in üblicher Weise getestet.

In bevorzugter Ausführungsform ist der Antikörper ein monoklonaler Antikörper. Zu seiner Herstellung werden nach vorstehender vierten Injektion den Mäusen Milzzellen entnommen und diese in üblicher Weise mit Myelomzellen fusioniert. Die weitere Klonierung erfolgt ebenso nach bekannten Verfahren.

Die vorliegende Erfindung stellt eine bisher nicht gekannte Zinkfinger-DNA sowie ein durch sie codiertes Zinkfinger-Protein bereit. Die erfindungsgemäße DNA eignet sich als Sonde für diagnostische Zwecke. Darüberhinaus kann sie in einem dem Fachmann bekannten Expressionsvektor zur Gentherapie eingesetzt werden. Das erfindungsgemäße Protein eignet sich ebenfalls für therapeutische Zwecke. Hierzu kann es in einer üblichen pharmazeutischen Zusammensetzung verabreicht werden.

-5-

Des weiteren stellt die vorliegende Erfindung gegen das vorstehende Protein gerichtete Antikörper bereit. Diese eignen sich bestens zu diagnostischen Zwecken.

Somit liefert die vorliegende Erfindung neue Mittel zur Diagnose und Therapie von mit der erfindungsgemäßen DNA und dem durch sie codierten Protein zusammenhängenden Erkrankungen, insbesondere von Tumorerkrankungen.

Kurze Beschreibung der Zeichnung:

- Fig. 1 zeigt die Insert-cDNA des Klons COS AP4-E1,
- Fig. 2 zeigt die Hybridisierung von PolyA⁺RNA aus verschiedenen Zellen mit der DNA zwischen den Nukleotiden 1240-1476 von COS AP4-E1,
- Fig. 3 zeigt eine Teilsequenz der genomischen Insert-DNA des Klons COS 1 APM, und
- Fig. 4 zeigt den Vergleich der DNA zwischen den Nukleotiden 1240-1476 von Klon COS AP4-E1 und der DNA zwischen den Nukleotiden 256-492 von Klon COS 1 APM.

Die Erfindung wird durch das folgende Beispiel erläutert.

Beispiel: Herstellung einer erfindungsgemäßen Zinkfinger-DNA

Eine aus HeLa-Zellen erstellte λ cDNA-Bibliothek wird einem üblichen Hybridisierungsverfahren unterzogen. Hierzu werden die durch Infektion der Bakterien erhaltenen Phagenplaques mit dem ³²p-markierten DNA-Insert des Klons COS AP4-E1, insbesondere der DNA zwischen den Nukleotiden 1240-1476 (vgl. Fig. 1), inkubiert. Es wird eine Hybridisierung mit einzelnen Phagenplaques erhalten. Aus diesen wird die Phagen-DNA isoliert und mit EcoRI gespalten. Die erhaltenen Fragmente werden in einem 0,5%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Agarosegel wird einem üblichen Blotting-Verfahren unterzogen, wodurch die DNA aus dem Agarosegel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen wird. Diese

-6-

wird in ein Hybridisierungsverfahren eingesetzt, in dem die entsprechende DNA des DNA-Inserts von Klon COS AP4-E1 als ^{32}p -markierte Probe verwendet wird. Es wird eine Hybridisierung mit einzelnen DNA-Fragmenten erhalten. Diese werden isoliert und in einem mit EcoRI gespaltenen, dephosphorylierten Plasmid-Vektor, z.B. pBluescript, kloniert. Einzelne Klone werden analysiert, und durch Restriktions-spaltungen sowie Sequenzierung wird ein eine erfindungsgemäße Zinkfinger-DNA enthaltender Klon identifiziert.

Patentansprüche

1. DNA, codierend für ein Zinkfinger-Protein, wobei die DNA umfaßt:
 - (a) die DNA der Nukleotide 446 - 1476 von Fig. 1 oder einen Teil davon,
 - (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA, oder
 - (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.
2. DNA nach Anspruch 1, nämlich die DNA der Nukleotide 256 - 492 von Fig. 3.
3. Protein, codiert durch die DNA nach Anspruch 1 oder 2.
4. Expressionsplasmid, umfassend eine für das Protein nach Anspruch 3 codierende DNA.
5. Transformante, enthaltend den Expressionsplasmid nach Anspruch 4.
6. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 3, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 5 unter geeigneten Bedingungen.
7. Verwendung der DNA nach Anspruch 1 oder 2 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie.
8. Verwendung des Proteins nach Anspruch 3 als Reagens zur Therapie.

Fig. 1 cDNA-Insert des Klons COS AP4-E1

10 30 50
1 ctgcaatggccaattgtgaagggtctggctgagaacatggccaatgacattgatgagct 60
-----+-----+-----+-----+-----+
gacgttaccgggttaacacttcccagaccgactcttgaccgggttactgtaactactcga

70 90 110
61 cattggcattcccttccccaaccacagcagtgggtcctgtgcagcctcaatgagcaacg 120
-----+-----+-----+-----+-----+
gtaaccgtaagggaaggggttggtgtcgtcactccaggacacgtcggagttactcgttgc

130 150 170
121 gcacgatggcctgctgtgtgacgtgctcctgggtggtgcaggagcaggagtatcggacca 180
-----+-----+-----+-----+-----+
cgtgctaccggagcagacactgcacgaggaccaccacgtcctcgtcctcatagcctgggt

190 210 230
181 ccgctccgtcctggctgectgCaGcAagtacttcaagaagcttttcacagccggcaccct 240
-----+-----+-----+-----+-----+
ggcgaggcaggaccgacggacGtCgTtcatgaagttcttcgaaaagtgtcggccgtggga

250 270 290
241 agccagccagccctacgtctatgagatcgactttgtccacctgaGgctctggctgctatc 300
-----+-----+-----+-----+-----+
tcggtcgggtcgggatgcagatactctagctgaaacagggtggactCcagagaccgacgatag

310 330 350
301 ctggagttcgctacacctccacGctcaccatcaccgctggcaatgtcaagcacatcctc 360
-----+-----+-----+-----+-----+
gacctcaagcggatgtggaggtgCgagtggtagtggcgaccgttacagttcgtgtaggag

370 390 410
361 aacgCagccaggatgctggagatccagtgcacGtgtaacgtgtgcctggagatcatggag 420
-----+-----+-----+-----+-----+
ttgcGtcgggtcctacgacctctaggtcacgtaGcacttgacacggacctctagtacctc

430 450 470
421 cctgggggggacgggggggaggaggatgacaaggaggacgatgacgacgaagatgat 480
-----+-----+-----+-----+-----+
ggacccccctgccccctcctcctactgttcctcctgctactgtgctgcttctacta
M T R R T M T T T K M M

490 510 530
481 gatgatgaggaggacgaagaggaggaggaggaagaggaggaggatgacgatgatgacacg 540
-----+-----+-----+-----+-----+
ctactactcctcctgcttctcctcctcctcctcctcctcctcctcctactgctactactgtgc
M M R R T K R R R R K R R R M T M M T R

550 570 590
gaGGActttGctgaccaagaaaacttGcctgacccccaggacatcagctgccaccaaagc

Fig. 1 (Fortsetzung I)

541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
ctCCTgaaaCgactgggtcttttgaaCggactgggggtctctgtagtcgacgggtggttcg
R T L L T K K T C L T P R T S A A T K A

610 630 650
ccttccaagacagaccatctcacagagaaggcctattcagacacccccagGgacttccct
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
ggaaggttctgtctggtagagtgtctcttccggataagtctgtgggggtcCctgaaggga
L P R Q T I S Q R R P I Q T P P G T S L

670 690 710
gactcttccaggctggcagtcctggccatctgggggtgatccgggacttctccatcgaat
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
ctgagaaggtccgaccgtcaggaccggtagacccccactaggccctgaagaggttagctta
T L P G W Q S W P S G G D P G L L H R I

730 750 770
ctctgctaagggagaacctgtaccccaaggccaacatccccgacagagaccctccttgtc
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
gagacgattccctcttggacatggggttccggtttaggggctgtctctgggaggaacag
S A K G E P V P Q G Q H P R Q R P S L S

790 810 830
tccattCgccccggacttctttccacacctctggccaggggacttcgGtgcctttgcccc
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
aggtaaGcggggcctgaagaaagggtgtggagaccggtccctgaagcCacggaaacgggt
P F A P D F F P H L W P G D F G A F A Q

850 870 890
gctgcctGAgCagcCcatggacagtgggcccactggatctggtcatcaagaatcgggaagat
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
cgacggaCTcGtcgGgtacctgtcacccggtgacctagaccagtagttcttagccttcta
L P E Q P M D S G P L D L V I K N R K I

910 930 950
caAggaggaggagaaggaggagctgccccccacccccaccgccacccttccctaatactt
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
gtTcctcctcctcttctcctcctcgacgggggtgggggtggcggtgggaagggaattactgaa
K E E E K E E L P P P P P P P P F P N D F

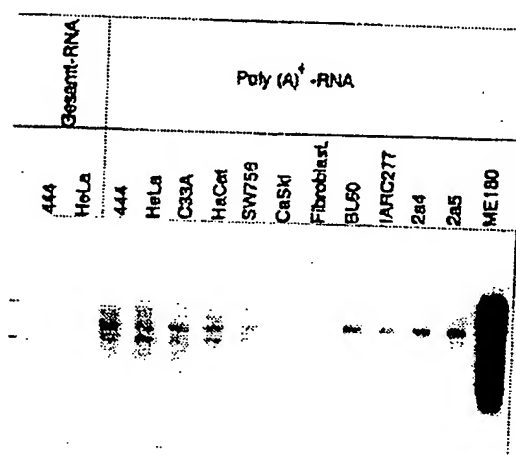
970 990 1010
cttcaaggacatgttccctgacctgccggggggcctctgggaCccatcaaggcggagaa
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
gaagttcctgtacaagggaactggacggcccccccgagaccctGggtagttccgcctctt
F K D M F P D L P G G P L G P I K A E N

1030 1050 1070
cgactacgGtgccttatctcaacttctcctgagtgcCACccacctGggaggcctcttcccacc
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
gctgatgcCacggatagagttgaaggactcacgGTGggtggaCctccggagaagggtgg
D Y G A Y L N F L S A T H L G G L F P P

Fig. 1 (Fortsetzung II)

	1090	1110	1130	
1081	ctggcccccgtgtagaagaGCgcaagctgaagccccaaggcctctcagcagtgcccatctg -----+-----+-----+-----+-----+			1140
	gaccggggaccatcttctCGcgttcgacttcgggttccggagagtcgtcacggggtagac W P L V E E R K L K P K A S Q Q C P I C			
	1150	1170	1190	
1141	ccacaaagtcatcatGgggggcgAgaaCGtgccgcAgcacatgaggaCccataccggggga -----+-----+-----+-----+-----+			1200
	ggtgtttcagtagtaCccccggcTcttGCacggcgTcgtgtactcctGggtatggcccct H K V I M G A E N V P Q H M R T H T G E			
	1210	1230	1250	
1201	gaagccatacatgtgcaccatctgcgaggtccgcttcaccaggcaggacaagctgaaaat -----+-----+-----+-----+-----+			1260
	cttcggtatgtacacgtggtagacgctccaggcgaagtgggtccgtcctgttcgacttta K P Y M C T I C E V R F T R Q D K L K I			
	1270	1290	1310	
1261	ccacatgcggaagcacacaggggagcggccctacctgtgcatccactgcaacgcCaagtt -----+-----+-----+-----+-----+			1320
	ggtgtacgccttcgtgtgtccccctcgccgggatggacacgtaggtgacgttgcgGttcaa H M R K H T G E R P Y L C I H C N A K F			
	1330	1350	1370	
1321	cgtgcacaactacgacctcaagaaccacatgcgcatccacacgggcgtgcggccctacca -----+-----+-----+-----+-----+			1380
	gcacgtgttgatgctggagttcttgggtgtacgcgtaggtgtgccgcacgcgggatggt V H N Y D L K N H M R I H T G V R P Y Q			
	1390	1410	1430	
1381	gtgcgagttctgctacaagagcttcacgcgctctgaccacctgcaccgccacatcaagcg -----+-----+-----+-----+-----+			1440
	cacgctcaagacgatgttctcgaagtgcgcgagactggtggacgtggcgggtgtagttcgc C E F C Y K S F T R S D H L H R H I K R			
	1450	1470		
1441	cczagctgccgcattggcacgccccgacgcggccgc -----+-----+-----+		1476	
	ggtctcgacggcggtaccgtgcggggctgcgcccgcg Q S C R M A R P D A A			

Fig.2 Hybridisierung von PolyA+RNA aus verschiedenen Zellen mit der DNA zwischen den Nukleotiden 1240-1476 von COS AP4-E1



444: nicht tumorigene HeLa x Fibroblasten-Hybridzelllinie
 HeLa: HPV18 positive Zervixkarzinomzelllinie
 C33A: HPV-negative Zervixkarzinomzelllinie
 HaCaT: spontan transformierte Vorhaut-Keratinocyten-Zelllinie, HPV-negativ
 SW756: HPV18-positive Zervixkarzinomzelllinie
 CaSki: HPV16-positive Zervixkarzinomzelllinie
 Fibroblast: humane epitheliale Lungenfibroblasten
 BL60: EBV-positive Burkitt's Lymphomzelllinie
 277: spontan transformierte lymphoblastoide Zelllinie
 2a4 und 2a5: nicht tumorigene BL60 x 277 Hybridzelllinie

Fig. 3 Teilsequenz der genomischen Insert-DNA des Klons COS 1 APM

```

      10              30              50
1  GAGCTCGGGTATAAAAGGAGTTTGGGGGAGTGGGGCTTTCAGGACACTGCTTTTTCCGCA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CTCGAGCCCATATTTTCCTCAAACCCCCTCACCCCGAAAGTCTGTGACGAAAAAGGCGT
                                     60

      70              90              110
61 TCCCTTTAATCCAGGTGAGTAACCATACTGTCTAAGGTGGGGCAGCAGTTGAGGGTAGA
   -----+-----+-----+-----+-----+
   AGGGAAATTAGGTCCACTCATTGGTATGGACAGATTCCACCCCGTCGTCAACTCCCATCT
                                     120

      130             150             170
121 TCTAGCATGAGACCTATTTCTGGGGTTTGACTCCATGGCAGTAGGGAGCCTCGGCTGGTT
   -----+-----+-----+-----+-----+
   AGATCGTACTCTGGATAAAGACCCCAAAGTACCGTACCGTCATCCCTCGGAGCCGACCAA
                                     180

      190             210             230
181 CTGGAGAAAGGGGAGCAAAAGGTTAGGAATGGCTCCTGGTGTTCCTGCGGACTGACCC
   -----+-----+-----+-----+-----+
   GACCTCTTTCCCCCTCGTTTTCCAATCCTTACCGAGGACCACAAGGGACGCCTGACTGGG
                                     240

      250             270             290
241 CCAGTCTCTGCATTGCAGGCAGGACAAGCTGAAAATCCACATGCGGAAGCACACAGGGGA
   -----+-----+-----+-----+-----+
   GGTCAGAGACGTAACGTCCGTCTGTTGCACTTTTAGGTGTACGCCTTCGTGTGTCCCCT
                                     300

      310             330             350
301 GCGGCCCTACCTGTGCATCCACTGCAACGCCAAGTTCGTGCACAACACTACGACCTCAAGAA
   -----+-----+-----+-----+-----+
   CGCCGGGATGGACACGTAGGTGACGTTGCGGTTCAAGCACGTGTTGATGCTGGAGTTCTT
                                     360

      370             390             410
361 CCACATGCGCATCCACACGGGCGTGCGGCCCTACCAAGTTCGAGTTCTGCTACAAGAGCTT
   -----+-----+-----+-----+-----+
   GGTGTACGCGTAGGTGTGCCCGCACGCCGGGATGGTCACGCTCAAGACGATGTTCTCGAA
                                     420

      430             450             470
421 CACGCGCTCTGACCACCTGCACCGCCACATCAAGCGCCAGAGCTGCCGCATGGCACGCCC
   -----+-----+-----+-----+-----+
   GTGCGCGAGACTGGTGGACGTGGCGGTGTAGTTCGCGGTCTCGACGGCGTACCGTGCGGG
                                     480

      490
481 CGACGCGGCGCGC
   -----+-----
   GCTGCGCGGCGC
      492

```

Fig. 4 Vergleich der DNA zwischen den Nukleotiden
1240-1476 von Klon COS AP4-E1 und der DNA
zwischen den Nukleotiden 256-492 von Klon
COS 1 APM

```

256 CAGGCAGGACAAGCTGAAAATCCACATGCGGAAGCACACAGGGGAGCGGC 305
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1240 caggcaggacaagctgaaaatccacatgcggaagcacacaggggagcggc 1289
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
306 CCTACCTGTGCATCCACTGCAACGCCAAGTTCGTGCACAACCTACGACCTC 355
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1290 cctacctgtgcatccactgcaacgcCaagttcgtgcacaactacgacctc 1339
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
356 AAGAACCACATGCGCATCCACACGGGCGTGCGGCCCTACCAGTGCGAGTT 405
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1340 aagaaccacatgcgcatccacacgggcgtgcggccctaccagtgcgagtt 1389
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
406 CTGCTACAAGAGCTTCACGCGCTCTGACCACCTGCACCGCCACATCAAGC 455
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1390 ctgctacaagagcttcacgcgctctgaccacctgcaccgccacatcaagc 1439
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
456 GCCAGAGCTGCCGCGATGGCAGCCCCGACGCGGCCGC 492
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1440 gccagagctgccgcatggcagccccgacgcggccgc 1476

```

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.

PCT/DE 95/01390

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C07K14/47 C12Q1/68 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K C12Q A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. VIROLOGY, vol. 65, no. 10, October 1991 pages 5564-5568, REUTER ET AL. 'Characterization of a novel human papillomavirus DNA in the cervical carcinoma cell line ME180' cited in the application see the whole document ---	1-8
A	EP,A,0 449 170 (BEHRINGWERKE) 2 October 1991 see the whole document ---	1-8
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 February 1996

Date of mailing of the international search report

21 03 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Gac, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: 11 Application No
PCT/DE 95/01390

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>NUCLEIC ACIDS RES., vol. 21, no. 17, 1993 page 4152 OLGIVIE ET AL. 'Sequence divergence of a TFIIIA-type zinc finger protein from fish ovarian tissue' see the whole document ---</p>	1-3
A	<p>PROC. NATL ACAD. SCI., vol. 91, no. 20, 27 September 1994 pages 9372-9376, GALERA ET AL. 'c-Krox, a transcriptional regulator of type I collagen gene expression, is preferentially expressed in skin' see the whole document -----</p>	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DE95/01390

Remark: Although claims 7 and 8 relate to treatment of the human/animal body (PCT Art. 17.2.a)i) and Rule 39.2.iv), methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods) search took place and was based on the mentioned effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 95/01390

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-449170	02-10-91	DE-A- 4010237	02-10-91
		AU-B- 7387291	03-10-91
		CA-A- 2039359	01-10-91
		JP-A- 7051068	28-02-95

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/DE 95/01390

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/12 C07K14/47 C12Q1/68 A61K38/17

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K C12Q A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	J. VIROLOGY, Bd. 65, Nr. 10, Oktober 1991 Seiten 5564-5568, REUTER ET AL. 'Characterization of a novel human papillomavirus DNA in the cervical carcinoma cell line ME180' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-8
A	EP,A.0 449 170 (BEHRINGWERKE) 2.Oktober 1991 siehe das ganze Dokument ---	1-8
-/--		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

A Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Februar 1996

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

21.03.96

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gac, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen

PCT/DE 95/01390

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>NUCLEIC ACIDS RES., Bd. 21, Nr. 17, 1993 Seite 4152 OLGIVIE ET AL. 'Sequence divergence of a TFIIIA-type zinc finger protein from fish ovarian tissue' siehe das ganze Dokument ---</p>	1-3
A	<p>PROC. NATL ACAD. SCI., Bd. 91, Nr. 20, 27.September 1994 Seiten 9372-9376, GALERA ET AL. 'c-Krox, a transcriptional regulator of type I collagen gene expression, is preferentially expressed in skin' siehe das ganze Dokument -----</p>	1-6

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 7,8 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers (Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird), beziehen (PCT Artikel 17.2.a)i) und Regel 39.2.iv), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. 7,8
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Anlage
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hatte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung... die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. Aktenzeichen

PCT/DE 95/01390

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-449170	02-10-91	DE-A- 4010237	02-10-91
		AU-B- 7387291	03-10-91
		CA-A- 2039359	01-10-91
		JP-A- 7051068	28-02-95

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.